

JP03/14423

PCT/JP03/14423

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

13.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年11月13日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-329427  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2002-329427]

出願人 東洋紡績株式会社  
Applicant(s):

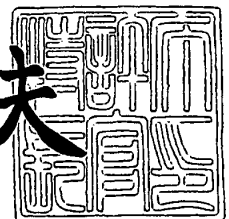
RECEIVED	
09 JAN 2004	
WIPO	PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 CN02-0901

【提出日】 平成14年11月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岸本 高英

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 曾我部 敦

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岡 正則

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

**【書類名】明細書**

**【発明の名称】** 基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼ、その製造法およびそれを用いた試薬組成物

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくともいずれか一方の特性を有することを特徴とするザルコシンオキシダーゼ。

    L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.7%以下

    L-プロリンに対するKm値：150mM以上

**【請求項2】** 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくともいずれか一方の特性を有することを特徴とするザルコシンオキシダーゼ。

    L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.5%以下

    L-プロリンに対するKm値：200mM以上

**【請求項3】** ザルコシンに対するKm値が10mM以下である、請求項1又は2記載のザルコシンオキシダーゼ。

**【請求項4】** ザルコシンに対するKm値が5mM以下である、請求項1又は2記載のザルコシンオキシダーゼ。

**【請求項5】** 請求項1～4のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼの生産能を有する微生物を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼの製造法

**【請求項6】** 請求項1～4のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

**【請求項7】** 請求項1～4のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、L-プロリンに対する作用性の小さい、基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼとその製造法、および該ザルコシンオキシダーゼを含む試薬組成物に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

ザルコシンオキシダーゼ (EC 1.5.3.1) は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。ザルコシンオキシダーゼは基質であるザルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

## 【0003】

このようなザルコシンオキシダーゼは、バチルス属 (特開昭54-52789号公報、特開昭61-162174号公報)、コリネバクテリウム属 (J. Biochem. 89, 599 (1981))、シリンドロカルボン属 (特開昭56-92790号公報)、シュードモナス属 (特開昭60-43379号公報)、アースロバクター属 (特開平2-265478号公報) 等の細菌が生産することが知られている。また、これら生産菌のザルコシンオキシダーゼ遺伝子を、遺伝子工学的手法により、大腸菌等の宿主を用いた大量生産する技術についても報告されている (特開平5-115281号公報、特開平6-113840号公報、特開平8-238087号公報)。

## 【0004】

しかしながら、従来のザルコシンオキシダーゼは血中に存在するアミノ酸の1種であるプロリンに対しても作用することが知られており、クレアチニン、クレアチンの測定の際に正誤差を生じる原因となり得ることが指摘されている (臨床化学、20, 144-152 (1991)、生物試料分析、17, 332-337 (1994))。この問題を解消するために、我々のグループは野生型ザルコシンオキシダーゼを蛋白質工学的に改変し、プロリンに対する作用性を低下させたザルコシンオキシダーゼ (特開平10-248572号公報) を報告したが、本来の基質であるザルコシンに対する作用性等については不明であり、更なる改良が望まれていた。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、プロリンに対する反応性の小さい、基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、ザルコシンに対する高い親和性を保持し、且つL-プロリンに対する作用性に小さいザルコシンオキシダーゼを造成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0007】

すなわち、本発明は以下のような構成から成る。

(1) 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくともいずれか一方の特性を有することを特徴とするザルコシンオキシダーゼ。

L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.7%以下

L-プロリンに対するKm値：150mM以上

(2) 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくともいずれか一方の特性を有することを特徴とするザルコシンオキシダーゼ。

L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.5%以下

L-プロリンに対するKm値：200mM以上

(3) ザルコシンに対するKm値が10mM以下である、(1)又は(2)記載のザルコシンオキシダーゼ。

(4) ザルコシンに対するKm値が5mM以下である、(1)又は(2)記載のザルコシンオキシダーゼ。

(5) (1)～(4)のいずれか1つに記載されるザルコシンオキシダーゼの生産能を有する微生物を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼの製造法

(6) (1)～(4)のいずれか1つに記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

(7) (1)～(4)のいずれか1つに記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

#### 【0008】

**【発明の実施の形態】**

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、臨床検査分野におけるクレアチン、クレアチニンの分析に有用である。

本発明のザルコシンオキシダーゼは、プロリンに対する作用性が本来の基質であるザルコシンに比べて十分に小さいことを特徴とする。プロリンに対する作用性は、ザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、L-プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比(%)より求めることができる。本願発明のザルコシンオキシダーゼは、L-プロリンに対する作用性がザルコシンに対する作用性の0.7%以下、好ましくは0.5%以下である。

**【0009】**

また、本発明のザルコシンオキシダーゼは、プロリンに対するKm値(ミカエリスメンテナンス定数)が高く、クレアチニンやクレアチン測定用試薬に適用した場合、検体中のプロリンの影響を受けにくい。本願発明のザルコシンオキシダーゼは、L-プロリンに対するKm値は150mM以上、好ましくは200mM以上である。

**【0010】**

更に、本願発明のザルコシンオキシダーゼは、測定試薬の必要添加量を抑えて、基質特異性の高さを活かすという観点から、ザルコシンに対するKm値は好ましくは10mM以下、更に好ましくは5mM以下である。

**【0011】**

本発明のザルコシンオキシダーゼは、上記の性質を有するものであれば、特に限定されるものではなく、例えば微生物や哺乳動物由来の酵素などを使用することができる。また、公知のザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学、蛋白質工学的技術を用いて改変した酵素、化学修飾により特性を改良した酵素も含まれる。

**【0012】**

本発明では一例として、アースロバクター・エスピーTE1826(微工研菌寄第10637号)のザルコシンオキシダーゼ(特開平2-265478号公報)を用いて、蛋白質工学的に改変した例を示す。本発明者らのグループは、既に、アースロバクター・エスピーTE1826より抽出した染色体DNAよりザル

コシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し (Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)に記載)、本ザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なザルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている (特開平6-113840号公報)。アースロバクター・エスピーTE1826のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。また、これらのアミノ配列をコードするDNA配列を、配列表の配列番号2に示す。

#### 【0013】

本発明のザルコシンオキシダーゼの製造方法は特に限定されないが、公知の酵素を蛋白質工学的手法を用いて改良する場合、以下に示すような手順で製造することが可能である。ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など) の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の利用が挙げられる。

#### 【0014】

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリイ (Escherichia coli) を宿主微生物とする場合にはpBluescript, pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリイ W3110、エシェリヒア・コリイ C600、エシェリヒア・コリイ JM109、エシェリヒア・コリイ DH5 $\alpha$  などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組

換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル（例えば、コンピテントハイJM109；東洋紡績製）を用いても良い。

#### 【0015】

こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6～48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0～9.0程度である。

#### 【0016】

また、本発明のザルコシンオキシダーゼを野生型酵素として保有する微生物であれば、各微生物の生育に適した培養条件で、適当な栄養培地を用いて培養して採取することができる。この際、該酵素の発現を誘導させるために、培地中にザルコシンやクレアチン、ジメチルグリシンなどを適量添加することが望ましい。

#### 【0017】

上記培養物中の、ザルコシンオキシダーゼを含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って該酵素が培養液中に存在する場合は

、濾過、遠心分離などにより、該酵素質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。ザルコシンオキシダーゼが菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じて EDTA 等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して該酵素を可溶化し、水溶液として分離採取する。

#### 【0018】

この様にして得られた粗抽出溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製されたザルコシンオキシダーゼを得ることができる。

#### 【0019】

本発明のクレアチン測定試薬は、上記プロリンに対する基質特異性が小さいザルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。また、クレアチニン測定試薬は、上記プロリンに対する基質特異性が小さいザルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。過酸化水素検出試薬とは、ザルコシンオキシダーゼにより生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下で、生成色素として測定する試薬であり、酸化系発色試薬及び必要に応じて 4-アミノアンチピリンや 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンなどのカップラーである。本発明の過酸化水素測定試薬は、各種の市販のものなどを用いることができるが、特に限定されるものではない。更に上記のクレアチンまたはクレアチニン測定試薬は、金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖類、有機酸などを安定化剤として使用することもできる。試薬性能に悪影響を及ぼさない範囲で防腐剤や界面活性剤を添加してもよい。また通常、適当な緩衝液と共に使用される。緩衝液の種類、濃度および pH は、各試薬成

分の保存および酵素反応など目的に応じて一種もしくは複数が選択されるが、いずれの緩衝液を用いるに際しても、酵素反応時のpHとしては5.0～10.0の範囲で使用されることが好ましい

#### 【0020】

本発明において、ザルコシンオキシダーゼ活性の測定は以下の条件で行う。

##### <試薬>

100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0) (200mM ザルコシンおよび0.1% トリトンX-100を含む)  
0.1% 4-アミノアンチピリン  
0.1% フェノール  
25U/ml ペルオキシダーゼ

##### <測定条件>

上記トリス塩酸緩衝液、4-アミノアンチピリン溶液、フェノール溶液、ペルオキシダーゼ溶液を5:1:2:2の比率で混合し反応混液を調製する。反応混液1mlを試験管に採り、37℃で約5分間中予備加温した後、酵素溶液0.05mlを添加し、反応を開始させる。37℃で正確に10分間反応させた後、0.25%SDS水溶液2.0mlを加えて反応を停止させ、この液の500nmの吸光度を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様の操作で吸光度を測定する。上記条件下で1分間に1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1単位とする。また、プロリンに対する反応性は、上記試薬中のザルコシンを同じ濃度のL-プロリンに置き換えた場合の活性の相対比として測定した。

#### 【0021】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

しかし、本発明はこれらに限定されるものではない。たとえば、後述の実施例3で示された9種類の改変型ザルコシンオキシダーゼのうち、SAOM2は、配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列の94位のバリンがグリシンに置換さ

れた変異体であるが、該変異体の性能に実質的な影響を与えない範囲で、さらに、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されていてもさしつかえない。SAOM2以外の変異体についても同様である。

#### 【0022】

##### 実施例1 ギャロコシンオキシダーゼの発現プラスミドの構築

アースロバクター・エスピーTE1826由来ギャロコシンオキシダーゼの発現プラスミドpSAOEP3は、特開平7-163341記載の方法に従って構築した。本発現プラスミドは、PUC18のマルチクローニングサイトに、TE1826のギャロコシンオキシダーゼをコードする遺伝子を含む約1.7Kbpの挿入DNA断片を含む。その塩基配列を配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるギャロコシンオキシダーゼアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

#### 【0023】

##### 実施例2 改変型ギャロコシンオキシダーゼ遺伝子の作製

ギャロコシンオキシダーゼ遺伝子を含む発現プラスミドpSAOEP3と、配列表の配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ギャロコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM1)を取得した。

pSAOEP3と、配列表の配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の94番目のバリンがグリシンに置換された変異型ギャロコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM2)を取得した。

pSAOEP3と、配列表の配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の322番目のリジンがアルギニンに置換された変

異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM3) を取得した。

pSAOM2 と、配列表の配列番号 6 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 94 番目のバリンがグリシン、250 番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM4) を取得した。

pSAOM4 と、配列表の配列番号 3 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがアルギニン、94 番目のバリンがグリシン、250 番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM5) を取得した。

pSAOM5 と、配列表の配列番号 7 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがアルギニン、94 番目のバリンがグリシン、213 番目のセリンがプロリン、250 番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM6) を取得した。

pSAOM6 と、配列表の配列番号 8 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがアルギニン、94 番目のバリンがグリシン、204 番目のメチオニンがアラニン、213 番目のセリンがプロリン、250 番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM7) を取得した。

pSAOM7 と、配列表の配列番号 9 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがアルギニン、94 番目のバリンがグリシン、166 番目のアスパラギンがリジン、204 番目のメチオニンがアラニン、213 番目のセリンがプロリン、250 番目のグルタミン酸がグルタミ

ンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM8) を取得した。

pSAOM8と、配列表の配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、94番目のバリンがグリシン、166番目のアスパラギンがリジン、204番目のメチオニンがアラニン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミン、322番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM9) を取得した。

#### 【0024】

#### 実施例3 改変型ザルコシンオキシダーゼの作製

pSAOM1、pSAOM2、pSAOM3、pSAOM4、pSAOM5、pSAOM6、pSAOM7、pSAOM8、pSAOM9の各組み換えプラスミドでエシェリヒアコリーJM109のコンピテントセルを形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

400mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したアンピシリンを100 $\mu$ l/mlになるように添加した。この培地に100 $\mu$ l/mlのアンピシリンを含むLB培地で予め30℃、16時間培養したエシェリヒアコリーJM109 (pSAOM1)の培養液を5ml接種し、30℃で20時間通気攪拌培養した。培養終了時のザルコシンオキシダーゼ活性は、前記活性測定において、培養液1ml当たり約9.5U/mlであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸および硫酸分画を行い、20mMリン酸緩衝液 (pH7.5) で透析した後、DEAEセファロースCL-6B (アマシャムバイオサイエンス製)、更に熱処理により分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一なバンドを示した。また、この変異体をSAOM1と命名した。

pSAOM2、pSAOM3、pSAOM4、pSAOM5、pSAOM6、pSAOM7、pSAOM8、pSAOM9の各組み換えプラスミドによるエシェリヒアコリーJM109形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。得られた酵素標品をそれぞれSAOM2、SAOM3、SAOM4、SAOM5、SAOM6、SAOM7、SAOM8、SAOM9と命名した。

#### 【0025】

##### 比較例1 野生型ザルコシンオキシダーゼの作製

比較例として、pSAOEP3によるエシェリヒアコリーJM109形質転換体について、上記方法と同様にして、改変前の精製酵素標品を取得した。

#### 【0026】

##### 実施例4 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価

実施例3および比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼについて評価を実施した。

プロリン作用性は、上記活性測定法により、ザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、L-プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比(%)より求めた。また、ザルコシンおよびL-プロリンに対するKm値は、上記活性測定法の基質濃度を変化させて測定した。その結果を表1に示す。表1から判るように、改変型ザルコシンオキシダーゼは、プロリンに対する反応性が0.7%以下、若しくはL-プロリンに対するKm値は150mM以上の少なくともいずれか一方を特性を有することが示された。

#### 【0027】

【表1】

改変体	変異	プロリン 作用性	Km値 (L- プロリン)	Km値 (ザルコ シン)
pSAOM1	K89R	0.70%	151mM	3.4mM
pSAOM2	V94G	0.45%	214mM	4.1mM
PSAOM3	K322R	0.42%	122mM	4.7mM
pSAOM4	V94G, E250Q	0.58%	213mM	3.4mM
pSAOM5	V94G, E250Q, K89R	0.55%	198mM	3.3mM
pSAOM6	K89R, V94G, S213P, E250Q	0.54%	210mM	3.5mM
pSAOM7	K89R, V94G, M204A, S213P, E 250Q	0.41%	203mM	3.4mM
pSAOM8	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q	0.41%	205mM	3.4mM
pSAOM9	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q, K322R	0.28%	202mM	4.4mM
改変前 (コントロール)	—	0.85%	142mM	3.4mM

## 【0028】

## 実施例6 クレアチニンの測定試薬におけるプロリンの影響

実施例3および比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に適応した際のプロリンの影響度を評価した。10U/mlザルコシンオキシダーゼ（実施例3および比較例1で調整したもの）、1mMエチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50mM塩化ナトリウム、0.1% (W/V) トリトンX-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS（同仁化学研究所製）、100U/mlクレアチニンアミドヒドロラーゼ（東洋紡製；CNH-211）、50U/mlクレアチンアミジノヒドロラーゼ（東洋紡製；CRH-221）、10U/mlペルオキシダーゼ（東洋紡製；PEO-301）を含む50mMPIPES-NaOH緩衝液（pH7.5）300 $\mu$ lに、5mg/dlクレアチニン水溶液10 $\mu$ lを加えて、37℃で5分間反応させ、546nmの吸光度変化をHITACHI7060型自動分析装置を用いて測定した。また、クレアチニン水溶液の代わりに100mg/dlL-プロリン水溶液を用いて、上記と同様の操作で吸光度変化を測

定した。プロリンの影響度は、クレアチニンを基質にした際に生じる反応5分間の吸光度増加に対する、L-プロリンを基質にした際に生じる反応5分間の吸光度増加の相対比(%)より求めた。その結果を表2に示す。表2から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に用いることで、該試薬のプロリンの影響度が低減していることが確認された。

【0029】

【表2】

改変体	変異	プロリン影響度
pSAOM1	K89R	5.7%
pSAOM2	V94G	3.6%
PSAOM3	K322R	3.5%
pSAOM4	V94G, E250Q	3.8%
pSAOM5	V94G, E250Q, K89R	3.5%
pSAOM6	K89R, V94G, S213P, E250Q	3.4%
pSAOM7	K89R, V94G, M204A, S213P, E250Q	3.2%
pSAOM8	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q	3.3%
pSAOM9	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q, K322R	1.9%
改変前 (コントロール)	—	7.2%

【0030】

#### 実施例7 クレアチニンの測定試薬におけるプロリンの影響

実施例3および比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に適応した際のプロリンの影響度を評価した。10U/mlザルコシンオキシダーゼ(実施例3および比較例1で調整したもの)、1mMエチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50mM塩化ナトリウム、0.1%(W/V

) トリトンX-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS (同仁化学研究所製)、50 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ (東洋紡製; CRH-221)、10 U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡製; PEO-301) を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 300  $\mu$ l に、5 mg/dl クレアチン水溶液 10  $\mu$ l を加えて、37℃ で 5 分間反応させ、546 nm の吸光度変化を HITACHI 7060 型自動分析装置を用いて測定した。また、クレアチン水溶液の代わりに 100 mg/dl L-プロリン水溶液を用いて、上記と同様の操作で吸光度変化を測定した。プロリンの影響度は、クレアチンを基質にした際に生じる反応 5 分間の吸光度増加に対する、L-プロリンを基質にした際に生じる反応 5 分間の吸光度増加の相対比 (%) より求めた。その結果を表 3 に示す。表 3 から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、クレアチン測定試薬に用いることで、該試薬のプロリンの影響度が低減していることが確認された。

#### 【0031】

##### 【発明の効果】

本発明によって、L-プロリンに対する作用性の小さい、基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼを供給することが可能となった。本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として使用することで、共存物質の影響を受けにくい、正確なクレアチン、クレアチニン測定が可能である。

#### 【0032】

【表3】

改変体	変異	ブロリン影響度
pSAOM1	K89R	5.3%
pSAOM2	V94G	3.1%
PSAOM3	K322R	3.2%
pSAOM4	V94G, E250Q	3.0%
pSAOM5	V94G, E250Q, K89R	3.4%
pSAOM6	K89R, V94G, S213P, E250Q	3.1%
pSAOM7	K89R, V94G, M204A, S213P, E 250Q	2.9%
pSAOM8	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q	3.1%
pSAOM9	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q, K322R	1.9%
改変前 (コントロール)	—	7.0%

## 【0033】

## 【配列表】

&lt;110&gt; Toyo Boseki Kabushiki Kaisya

&lt;120&gt; 改変型ザルコシンオキシダーゼ

&lt;130&gt; 02-0901

&lt;141&gt; 2002-11-13

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Version 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 389

&lt;212&gt; PRT

<213> アースロバクター・エスピー (Arthrobacter SP.) TE1826

<400> 1

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

1 5 10 15

Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr

20 25 30

Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His

35 40 45

Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr

50 55 60

Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys

65 70 75 80

Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly

85 90 95

Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys

100 105 110

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys

115 120 125

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu

130 135 140

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg  
145 150 155 160

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val  
165 170 175

Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr  
180 185 190

Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn  
195 200 205

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr  
210 215 220

Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn  
225 230 235 240

Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr  
245 250 255

Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His  
260 265 270

Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly  
275 280 285

Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr  
290 295 300

Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr  
305 310 315 320

Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe  
325 330 335

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe  
340 345 350

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys  
355 360 365

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys  
370 375 380

Gln Lys Glu Thr Ile  
385

<210> 2

<211> 1167

<212> DNA

<213> アースロバクター・エスピー (Arthrobacter SP.) TE1826

<400> 2

atg agt att aaa aaa gat tat gat gta att gtg gtt ggc gct ggt tcc 48  
Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser  
1 5 10 15

atg gga atg gca gct ggg tac tat ctg tct aaa caa ggt gtt aaa aca 96

Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr  
20 25 30

cta ttg gta gat tca ttt cat cct ccc cat aca aat ggc agc cat cat 14  
4

Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His  
35 40 45

ggc gat aca cgg atc att cgt cac gca tat ggc gaa gga aga gag tat 19  
2

Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr  
50 55 60

gta ccg ttt gcc ttg aga gca caa gag tta tgg tat gaa tta gaa aag 24  
0

Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys  
65 70 75 80

gag act cat cat aaa ata ttt aca aaa aca ggt gta ctc gtt ttt ggt 28  
8

Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly  
85 90 95

cct aaa gga gaa gct cct ttc gtt gcc gaa aca atg gaa gcc gca aag 33  
6

Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys  
100 105 110

gaa cat tca tta gat gtt gat tta cta gaa gga agt gaa ata aat aag 38

4

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys

115

120

125

cgt tgg cca ggt gta acg gtt cct gag aat tat aat gct att ttt gaa 43

2

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu

130

135

140

aaa aat tct ggt gtc tta ttt agt gaa aat tgt att cgc gct tac cgt 48

0

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg

145

150

155

160

gaa ttg gcg gaa gca aat ggt gcg aaa gtt cta acg tac aca ccc gtt 52

8

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val

165

170

175

gaa gat ttc gag att gcc gag gac ttc gtc aaa atc caa acc gcc tat 57

6

Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr

180

185

190

ggc tcc ttt aca gcc agt aaa tta att gtt agc atg ggc gct tgg aat 62

4

Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn

195

200

205

agc aaa ctg cta tca aaa tta aat att gaa atc cca ttg cag cca tac 67

2

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr

210

215

220

cgt caa gtt gtc gga ttc ttc gaa tgt gat gaa aaa aaa tat agc aat 72

0

Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn

225

230

235

240

aca cat ggt tat ccg gcg ttc atg gtc gaa gtc cca act ggc atc tat 76

8

Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr

245

250

255

tac gga ttt cca agc ttc ggc ggc tgc ggc ttg aaa ata ggc tat cat 81

6

Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His

260

265

270

acg tat ggt caa aaa atc gat cca gat acg att aat cgt gaa ttt ggt 86

4

Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly

275

280

285

att tac ccg gag gat gaa ggg aat att cgc aaa ttc ctg gaa aca tat 91

2

Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr

290

295

300

atg ccg gga gca acc ggc gaa tta aaa agt ggg gca gtt tgc atg tac 96

0

Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr

305 310 315 320

aca aaa aca cct gat gag cat ttc gtg att gat tta cat cct caa ttc 100

8

Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe

325 330 335

tcg aat gtc gcg att gca gcc gga ttc tcc gga cat ggg ttt aaa ttc 105

6

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe

340 345 350

tca agc gta gtt ggt gaa aca tta agt caa tta gct gta acc ggt aaa 110

4

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys

355 360 365

aca gaa cac gat att tcc atc ttt tca atc aat cgc cct gct tta aaa 115

2

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys

370 375 380

caa aaa gaa acg att 116

7

Gln Lys Glu Thr Ile

385

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;400&gt; 3

gactcatcat aaaatattta caagaacagg tgtactcg 38

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;400&gt; 4

caaaaacagg tgtactcggg tttggccta aaggag 36

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;400&gt; 5

gtttgcatgt acacaagaac acctgatgag catttcg 37

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;400&gt; 6

ccggcggttca tgggtccaggc cccaactggc atc 33

<210> 7

<211>

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 7

gaatagcaaa ctgctaccaa aattaaatat tgaaatcc 38

<210> 8

<211>

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 8

CCAGTAAATT AATTGTTAGC GCGGGCGCTT GGAATAG 37

<210> 9

<211>

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 9

GAATTGGCGG AAGCAAAAGG TGC GAAAGTT CTAACG 36

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、プロリンに対する反応性の小さい、基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

【解決手段】

37℃、pH8.0の測定条件下で、L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.7%以下、L-プロリンに対するKm値：150mM以上、の少なくともいずれか一方の特性を有するザルコシンオキシダーゼ、該ザルコシンオキシダーゼの生産能を有する微生物を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取する基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼの製造法、該ザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬、クレアチン測定用試薬。

特願2002-329427

出願人履歴情報

識別番号

[000003160]

1. 変更年月日  
[変更理由]

1990年 8月10日

新規登録

住 所  
氏 名

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号  
東洋紡績株式会社